

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 709–713

Ein Durchflußmeßsystem zur O₂-sensitiv-enzymatischen Glucose-Analyse

Von J. G. Schindler, W. Riemann,

Institut für Angewandte Physiologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn,

D. Sailer, G. Berg,

Abteilung für Stoffwechsel und Ernährung (Vorsteher: Prof. Dr. Dr. h. c. G. Berg) in der Medizinischen Klinik mit Poliklinik der Universität Erlangen-Nürnberg

und

W. Schäl,

Dr. E. Fresenius KG, Forschungsstelle Marburg/Lahn

(Eingegangen am 18. Juni/30. Juli 1977)

Zusammenfassung: Es wird ein Durchflußmeßsystem zur O₂-sensitiv-enzymatischen Glucose-Analyse beschrieben. Leckstromsicher verschweißte PTFE-Membranen tragen erheblich zur Wartungsfreundlichkeit der O₂-Sensoren bei. Die Anwendung löslicher oder immobilisierter Glucoseoxidase stellen Alternativen für Analysenautomaten dar. Bleibt man beim Prinzip der O₂-Elektrode, so können auch andere enzymatische Reaktionen mit O₂-Umsatz gemessen werden.

A flow-through method for the O₂-sensitive, enzymatic analysis of glucose

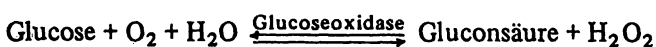
Summary: A flow-through glucose-analyser is described based on an oxygen-sensitive enzymatic system. Leak-current-proof welded PTFE-membranes contribute considerably to an easy maintenance of the O₂-sensors. Soluble or immobilized glucose oxidase may be used in automatic analysers. As a primary instrument of analysis, the oxygen pO₂-electrode lends itself to the measurement of other enzymatic reactions that involve oxygen.

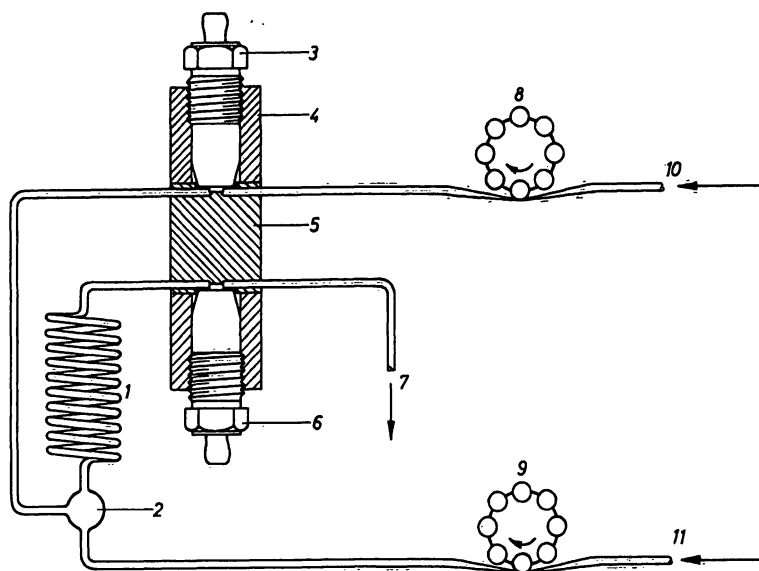
Einführung

Elektrochemisch-enzymatische Meßverfahren haben im Hinblick auf klinisch-chemische Analysen-Automaten und kontinuierliche Direktmessungen am Patienten neben ionenselektiven Disk-Elektroden (1–4) und Gassensoren (1, 3) in elektrochemischen Multimeßsystemen (1, 3) einen besonderen Stellenwert. Grundlage der elektrochemisch-enzymatischen Analytik ist die Messung von Ionen (4, 5) oder Gasen (6, 7) nach enzymatischem Substratumsatz. Eine andere Möglichkeit sieht ein amperometrisches Verfahren vor, bei dem eine Platinelektrode mit einer Enzymschicht beschickt wird und der Ablauf der Enzymreaktion an einen Redoxprozeß gekoppelt ist, so daß eine Stromstärkemessung in Relation zur Substratkonzentration

über die elektrolytische Oxidation des reduzierten Akzeptors möglich wird (8). Ionenselektive (4) und gassensitive Messungen in elektrochemisch-enzymatischen Analysensystemen ermöglichen bei zwei gleichartigen Sensoren, eine plötzlich nicht enzymatisch bedingte Pegeländerung von Meßion oder -gas in der Probenflüssigkeit zu korrigieren.

Im folgenden wird daher ein O₂-sensitiv-enzymatischer Glucose-Durchflußanalysator mit zwei polarographisch arbeitenden Pt-Elektroden vorgestellt, die durch leckstromsicher verschweißte PTFE-Membranen wartungsfreundlich sind. Dabei wird der Sauerstoffverbrauch nach partiellem Umsatz von β -D-Glucose zu Gluconsäure zeitkonstant elektrochemisch gemessen.



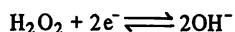
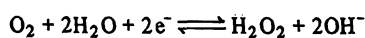
Abb. 1. O₂-sensitiv-enzymatisches Durchflußmeßsystem

- 1 Enzym-Reaktor
- 2 Mischkammer
- 3 O₂-Sensor I
- 4 Metallrahmen
- 5 Parallelepipedischer Isolierkörper aus Acrylglas mit eingefrästen Meßkammern (1 µl)
- 6 O₂-Sensor II
- 7 Abfluß
- 8 Rollerpumpe I
- 9 Rollerpumpe II
- 10 Meßlösung
- 11 Enzymlösung (pO₂ konstant)

Technik und Methodik

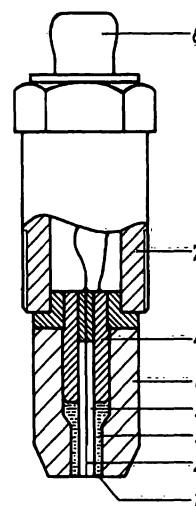
Zwei in Reihe geschaltete pO₂-Elektroden grenzen an nacheinander von dem Strömungsmittel durchflossene Meßkammern mit einem Füllvolumen von 1 µl. Beide sind in strömungsgünstiger Geometrie als wannenförmig abgeflachte Vertiefung an der Oberfläche eines parallelepipedischen Isolierkörpers ausgebildet und über radiale Zu- und Ableitungskanäle erreichbar sowie durch einen Enzymreaktor, der das Enzym auch in immobilisierter Form beherbergen kann, getrennt (Abb. 1). Bei Substratumsatz mit löslicher Glucoseoxidase wird das Enzym vor dem Reaktor mit einer zweiten Pumpe kontinuierlich zugemischt (Abb. 1). Ein Metallrahmen übernimmt die richtige räumliche Zuordnung der Meßstellenplätze; die Sensoren werden in „zündkerzenartiger“ Bauform unter Zuhilfenahme eines Drehmomentschlüssels mit der Stirnfläche dichtend gegen die Berandung der Durchflußkammer angezogen. Die Messungen werden bei konstanter Temperatur durchgeführt.

Die Messung des Sauerstoffpartialdruckes basiert auf dem Reduktionsstrom bei konstanter Spannung im Bereich des Diffusionsgrenzstromes als Maß für die in der Zeiteinheit die Platin-kathode erreichenden O₂-Moleküle (9, 10). Silberanode, Elektrolytlösung gepuffert – z. B. 0,2 mol/l KCl- und ionenundurchlässige, aber gaspermeable PTFE-Membran komplettieren die O₂-Elektrode (Abb. 2). Der Mechanismus der kathodischen Sauerstoffreduktion dürfte im neutralen oder alkalischen Medium wahrscheinlich folgendermaßen ablaufen (11):



Kinetik und noch nicht vollständig geklärter Reaktionsablauf stehen immer wieder im Mittelpunkt von Untersuchungen (12). Die Reaktionsgeschwindigkeit der kathodischen Sauerstoffreduktion nimmt in folgender Reihenfolge Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺ und (CH₃)₄N⁺ ab und kann als spezifische Wirkung der Kationen gedeutet werden (12).

Als treibende Kraft für den transmembranösen Gastransport ist der O₂-Partialdruck verantwortlich. Bei der in Abbildung 2 dargestellten Konstruktion mit wahlweise auch mehreren stirnflächenfreien 15 µm Pt-Drahtseelen in einem höchstens 1 mm starken (φ) Glasmantel erübrigen sich besondere Maßnahmen wie

Abb. 2. O₂-Sensor

- 1 Leckstomsicher verschweißte PTFE-Membran
- 2 Pt-Kathode
- 3 Glasisolationsmantel
- 4 Ag-Anode
- 5 Innen-Elektrolytlösung z. B. 0,2 mol/l KCl
- 6 Abnehmbare PTFE-Kappe
- 7 Gewinde M8 x 0,75
- 8 Steckkontakt
Sechskant (SW 8) für Drehmomentschlüssel
Sensorlänge 25 mm

ein Raushschleifen des die Platinkathode umgebenden Glasisolationsmantels oder Einlegen eines 12 µm starken Cellophanplättchens (11, 13) zwischen Membraninnenseite und glasummantelter Pt-Kathode. Trotz der Verwendung von Kunststoffteilen für das Meßsystem ist die Anzeige stabil und reproduzierbar, da sich ein Fließgleichgewicht zwischen O₂-Eigenverbrauch der Meßfühler, der geringen Löslichkeit von Gasen in den Kunststoffteilen des Gesamtsystems und dem O₂-Angebot des Meßgutes einstellt. Eine Sauerstoffverarmung an der Membranaußenfläche kann bei Durchflußmessungen nicht auftreten, da eine Teilchenbewegung per se stattfindet.

pO₂-Elektroden werden nach Erneuerung gealterter Innen-Elektrolytlösungen wieder einsetzbar. Daher trägt eine abnehmbare PTFE-Kappe mit leckstromsicher verschweißter circa 12 µm starker PTFE-Membran erheblich zur Wartungs- und Benutzerfreundlichkeit dieser Sensoren bei. Anstelle bisher üblicher mechanischer Befestigung der gaspermeablen Folie durch O-Ring oder Faden wird mit einer Verschweißung der PTFE-Membranen auf eine aus dem gleichen Material bestehende Hülse (Abb. 3) eine leckstromsichere Inbetriebnahme gewährleistet. Das Verschweißen wird mit einem Widerstandsschweißgerät unter fortlaufender Kontrolle der Schweißtemperatur am Schweißformwerkzeug mittels NiCr-Konstantan-Thermoelementen bei einer Temperatur von etwa 395°C (Abb. 4) durchgeführt (1–3). Zur Dichtigkeitskontrolle der Schweißnaht erfolgt eine Leckstromprüfung.

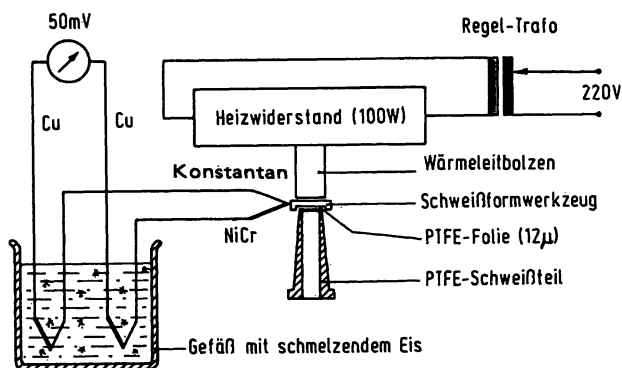


Abb. 3. Schema der Schweißtechnik für PTFE-Folien

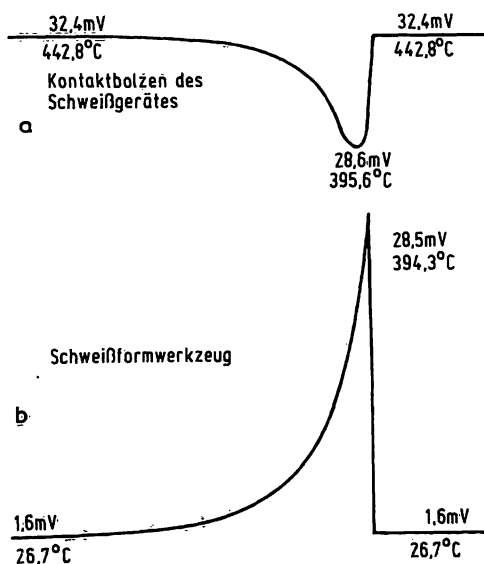


Abb. 4. NiCr-Konstantan-Thermospannungen bei PTFE-Folienverschweißungen an elektrochemischen Sensoren. Papiertransport: 30 mm/min (a), 10 mm/min (b).

Der Reduktionsstrom ist im Bereich des Diffusionsgrenzstromes proportional dem Sauerstoffangebot aus dem Meßmedium und steigt außerdem etwa proportional mit der Größe der Kathodenflächen. Die Wahl einer möglichst kleinen Kathodenfläche ist vorteilhaft, weil der durch die Messung bedingte Verbrauch an Sauerstoff unter dieser Voraussetzung nur sehr gering ist. Dadurch erst wird es möglich, in sehr geringen Probenvolumina bzw. bei sehr geringen Strömungsgeschwindigkeiten stabile Meßwerte zu erhalten. Bei einem Durchmesser von 15 µm der kreisförmigen Kathodenfläche liegt der Reduktionsstrom in der Größenordnung von 10 pA/mbar, so daß an den verwendeten Strommesser sehr hohe Anforderungen hinsichtlich Empfindlichkeit und Stabilität zu stellen sind. Es ist außerdem zweckmäßig, die Erzeugung der Polarisationsspannung unmittelbar in den Meßkreis zu integrieren. Das Prinzip der hierzu verwendeten Schaltung ist in Abbildung 5a und 5b dargestellt. Hauptbestandteil des Strommessers ist ein Operationsverstärker, dessen Eingangsstrom wesentlich kleiner als die zu messenden Ströme sein muß (< 0,1 pA). Der zu messende Strom I_e wird durch den Operationsverstärker über den Meßwiderstand R_M selbsttätig kompensiert. Die sich einstellende Ausgangsspannung gehorcht der Beziehung $U_a = I_e R_M / (1 - k)$, wobei der Faktor k zur Kalibrierung an einem Potentiometer eingestellt werden kann. Die einstellbare Polarisationsspannung wird dem zweiten Eingang des Operationsverstärkers zugeführt und kann zur Kontrolle über einen Umschalter auf das Anzeigeinstrument geschaltet werden. Zur direkten Anzeige der Differenz der Ströme von zwei Elektroden wird die in Abbildung 5 angegebene Anordnung benutzt, bei der die Ausgänge von zwei Strommessern mit den Eingängen eines Differenzverstärkers verbunden sind.

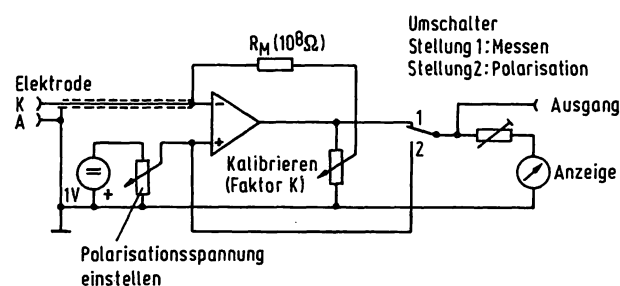


Abb. 5a. Prinzipschaltbild des Strommessers

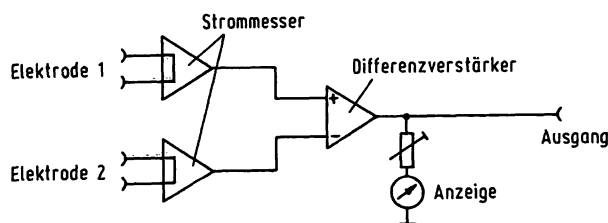


Abb. 5b. Differenzbildung von zwei Strom-Meßkreisen

Ergebnisse

An einem bei 37°C thermostatisierten Meßplatz wurden die O₂-Sensoren mittels wasserdampfgesättigter Gase fortlaufend angeströmt und kalibriert. Die Anzeige-geschwindigkeit (100% Endwert) lag bei 10 bis 30 s. Die Elektrodensteilheit betrug bei konstanter Polarisationsspannung von 800 mV 2×10^{-2} nA/Torr O₂ bei einer Meßgenauigkeit von $\pm 1,0$ Torr O₂ und besser. In Abwesenheit des Depolarisators O₂ liefern N₂ und CO₂ in neu abgefüllten Innen-Elektrolytlösungen bei einem Auflösungsvermögen des Meßgerätes von 10^{-2} nA einen Grundstrom von maximal 0,01 nA, der in gealterten bis auf 0,05 nA ansteigen kann. Elektrochemisch-

enzymatische Glucose-Bestimmungen wurden mit löslicher Glucoseoxidase im Überschuß bei Reaktor-Zeiten von 10 bis 20 s durchgeführt. Der bis auf 27,8 mmol/l (5 g/l) ausgelegte Meßbereich wurde mit Standardlösungen und Kontrollseren zwischen 2,78 und 27,8 mmol/l (0,50 und 5,00 g/l) ausgetestet. Die Meßwerte sind auf 30 mg/l und besser reproduzierbar. Beide O₂-Sensoren können mit getrennter Signalverarbeitung betrieben werden oder gekoppelt eine Differenzmessung durchführen. Der Sensor I (Abb. 1) übernimmt in jedem Fall Detektoraufgaben hinsichtlich der pO₂-Konstanz der Meßlösung.

Das Gesamtsystem ist robust und einfach zu bedienen. Die leckstromsicher verschweißte PTFE-Membran der O₂-Sensoren trägt erheblich zur Wartungsfreundlichkeit bei.

Diskussion

Elektrochemisch-enzymatische Meßverfahren zur Bestimmung von Glucose (6–8, 14–21) stellen eine Bereicherung dar.

Bei der amperometrischen Bestimmungsmethode von Glucose (8) ist Hexacyanoferrat-(III) ein möglicher Elektronenakzeptor, der das Enzym in die oxidierte Form zurückzuführen vermag, wobei das resultierende Hexacyanoferrat-(II) an einer Pt-Elektrode oxidiert wird. Durch Nebenreaktionen auch im Hinblick auf die stets in Spuren vorhandene Katalase und die Möglichkeit, daß Hexacyanoferrat-(II) durch H₂O₂ oxidiert wird, geht ein Teil des Meßstromes verloren; andererseits kann durch reduzierende Metaboliten ein Zusatzstrom gemessen werden. Dagegen stellen die geringen Konzentrationen von Enzyminhibitoren oder strukturmäßig ähnliche Zucker wie die 2-Desoxy-D-glucose in physiologischen Flüssigkeiten keinen wesentlichen Störfaktor dar (8).

Mittels zweier Jodid-Elektroden läßt sich der Glucoseumsatz über die durch Peroxidase katalysierte Zweit-

reaktion in Abwesenheit einiger Oxidations- und Reduktionsmittel messen (18).

Dagegen lassen sich Konkurrenzreaktionen mit reduzierenden Substanzen durch auf der Erstreaktion basierende O₂-sensitiv-enzymatische Bestimmungsverfahren vermeiden (22). Um der Zersetzung von H₂O₂ durch Katalase-Fremdaktivität und damit einer unerwünschten O₂-Freisetzung vorzubeugen, kann durch Ethanolzusatz in der Zweitreaktion ein sauerstoff-freier Umsatz katalysiert werden (22) oder durch Jodid- und Molybdat-Zugabe eine quantitative Zersetzung von H₂O₂ (17) in lange gelagerten katalasearmen Reagenzien erzwungen werden (22). Die Meßtechnik mit zwei gleichartigen pO₂-Sensoren erlaubt, eine aus anderen Gründen als der hochspezifischen Enzymreaktion resultierende Partialdruckänderung des Sauerstoffes im Probenmedium zu erkennen. Dies ist im Hinblick auf fortlaufende Messungen von erheblicher Bedeutung. Immobilisierte Enzyme (23–31) stellen eine wirtschaftlichere Alternative als die Verwendung löslicher Enzyme für Analysenautomaten dar. In dieser Hinsicht verdienen Schlauchreaktoren mit wandständig fixierten Enzymen (32, 33) besonderes Interesse. Somit steht für die mechanisierte, kontinuierliche patientennahe in vivo-Analyse der Blutglucose (34–37) eine einfache, schnelle und zuverlässige Methodik auf kleinstem Raum zur Verfügung.

Verschiedene Verfahren zur elektrochemisch-enzymatischen Bestimmung von Harnsäure (38), Hypoxanthin und Xanthin (3) und Cholesterin (39, 40) wurden erarbeitet beziehungsweise vorgeschlagen. Auch Alkohol-Oxidase (41) und L-Aminosäure-Oxidase (19, 42, 43) katalysierte Reaktionen lassen sich in die Reihe O₂-sensitiv-enzymatischer Messungen einordnen.

Bleibt man beim Prinzip der O₂-Elektrode, so dürften alle diese enzymatischen Reaktionen unter O₂-Umsatz mit dem hier vorgestellten Analysensystem gemessen werden können.

Literatur

- Schindler, J. G. (1977), *Biomed. Techn.* 22, 235–244.
- Schindler, J. G. & Riemann, W. (1975), *Biomed. Techn.* 20, 75–76.
- Schindler, J. G. & Riemann, W. (1977), *Elektrochemische Multimeßsysteme für Physiologie und Medizin. Koordinierte Forschung des Institutes für Angewandte Physiologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn und der Dr. E. Fresenius Chemisch-pharmazeutische Industrie KG Apparatebau KG in Bad Homburg v. d. H. 1. Aufl.*
- Schindler, J. G., Schindler, R. G., Aziz, O., *Durchflußsystem zur NH₄⁺-selektiv-enzymatischen Harnstoffmessung. In Vorbereitung.*
- Guilbault, G. G. (1971), *Pure Appl. Chem.* 25, 727–740.
- Clark, L. C. & Sachs, G. (1968), *Bioelectrodes for Tissue Metabolism. In: Bioelectrodes (Feder, W., Weyer, E. M., Krauss, M. & La Mirande, A. G. eds.). Ann. N. Y. Acad. Sci.* 148, 133–153.
- Udipke, S. J. & Hicks, G. P. (1967), *Nature* 214, 986–988.
- Mindt, W., Racine, Ph. & Schläpfer, P. (1973), *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 77, 804–808.
- Clark, L. C. (1956), *Trans. Amer. Soc. Art. Int. Organs* 2, 41–49.
- Clark, L. C., Wolf, R., Granger, D. & Taylor, Z. (1953), *J. Appl. Physiol.* 6, 189–193.
- Gambino, R., Thiers, R., Becker, S. & Bates, G. D. (1970), *Stand. Meth. Clin. Chem.* 6, 171–182.
- Gleichmann, U. & Lübbers, D. W. (1960), *Pflügers Arch.* 271, 431–455.
- Fabjan, C., Lopreis, A. & Neckel, A. (1976), *Monatsh. Chem.* 107, 1209–1219.
- Thews, G. (1962), *Pflügers Arch.* 276, 89–98.
- Guilbault, G. G. & Lubrano, G. J. (1972), *Anal. Chim. Acta* 60, 254–256.
- Guilbault, G. G. & Lubrano, G. J. (1973), *Anal. Chim. Acta* 64, 439–455.

16. Martiny, S. C., Jensen, O. J. (1976), An Enzyme Electrode Based on Immobilized Glucose Oxidase. In: Ion and Enzyme Electrodes in Biology and Medicine (Kessler, M., Clark, L. C., Lübbers, D. W., Silver, I. A., Simon, W. eds.), S. 198–199, Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien.
17. Mell, L. D. & Maloy, J. T. (1976), *Anal. Chem.* **48**, 1597–1601.
18. Nagy, G., von Storp, L. H. & Guilbault, G. G. (1973), *Anal. Chim. Acta* **66**, 443–455.
19. Nanjo, M. & Guilbault, G. G. (1974), *Anal. Chim. Acta* **73**, 367–373.
20. Nilsson, H., Akerlund, A.-C. & Mosbach, K. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **320**, 529–534.
21. Silver, I. A. (1976), An Ultra Micro Glucose Electrode. In: Ion and Enzyme Electrodes in Biology and Medicine (Kessler, M., Clark, L. C., Lübbers, D. W., Silver, I. A. & Simon, W. eds.), S. 189–192. Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien.
22. Firmenschrift Beckman: Bedienungsanleitung für den Glukose-Analysator. (1973)
23. Bowers, L. D. & Carr, P. W. (1976), *Anal. Chem.* **48**, 544A–559A.
24. Dunn, I. J. (1975), *Chimia* **29**, 103–109.
25. Fishman, M. M. & Schiff, H. F. (1976), *Anal. Chem.* **48**, 322R–332R.
26. Konecny, J. (1975), *Chimia* **29**, 95–102.
27. Krasnobajew, V. & Böniger, R. (1975), *Chimia* **29**, 123–131.
28. Manecke, G. (1974), *Chimia* **28**, 467–474.
29. Nelboeck, M. & Jaworek, D. (1975), *Chimia* **29**, 109–123.
30. Orth, H. D. & Brümmer, W. (1972), *Angew. Chem.* **84**, 319–330.
31. Weetall, H. H. (1976), *Chimia* **30**, 429–430.
32. Filippusson, H., Hornby, W. E. & McDonald, A. (1972), *FEBS Letters* **20**, 291–293.
33. Morris, D. L., Campbell, J. & Hornby, W. E. (1975), *Biochem. J.* **147**, 593–603.
34. Berg, G. & Sailer, D. (1977), Experience in Glucose Metabolism Monitoring. In: Blood Glucose Monitoring. Methodology and Clinical Application of Continuous in Vivo Glucose Analysis (Kruse-Jarres, J. D. & Molnar, G. D. eds.). *Horm. Met. Research, Supp.* **7**, 41–53.
35. Sailer, D., Kellner, R. & Berg, G. (1977), *Intensivmedizin, im Druck.*
36. Sailer, D., Berg, G. & Matzkies, F. (1974), *Biomed. Techn.* **19**, 134–137.
37. Sailer, D., Kellner, R., Eberlein, W. & Berg, G. (1976), *Biomed. Techn.* **21**, Ergänzungsband 195.
38. Nanjo, M. & Guilbault, G. G. (1974), *Anal. Chem.* **46**, 1769–1772.
39. Clark, L. C. & Emory, C. R. (1976), The Measurement of Cholesterol and its Esters Using a Polarographic Anodic Enzyme Electrode. In: Ion and Enzyme Electrodes in Biology and Medicine, (Kessler, M., Clark, L. C., Lübbers, D. W., Silver, I. A. & Simon, W. eds.) Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien S. 161–172.
40. Papastathopoulos, D. S. & Rechnitz, G. A. (1975), *Anal. Chem.* **47**, 1792–1796.
41. Guilbault, G. G. & Lubrano, G. J. (1974), *Anal. Chim. Acta* **69**, 189–194.
42. Guilbault, G. G. & Hrabánková, E. (1970), *Anal. Chem.* **42**, 1779–1783.
43. Guilbault, G. G. & Lubrano, G. J. (1974), *Anal. Chim. Acta* **69**, 183–188.

Dr. Dr. J. G. Schindler
W. Riemann
Institut für Angewandte Physiologie
der Philipps-Universität Lahnberge
D-3550 Marburg/Lahn

Dr. D. Sailer
Prof. Dr. Dr. h. c. G. Berg
Abteilung für Stoffwechsel und Ernährung
in der Medizinischen Klinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Krankenhausstr. 12
D-8520 Erlangen

Dr. W. Schäl
Dr. E. Fresenius KG
Forschungsstelle Marburg/Lahn
Schlosserstr. 12
D-3550 Marburg/Lahn

